

ÉRTEKEZÉSEK EMLÉKEZÉSEK

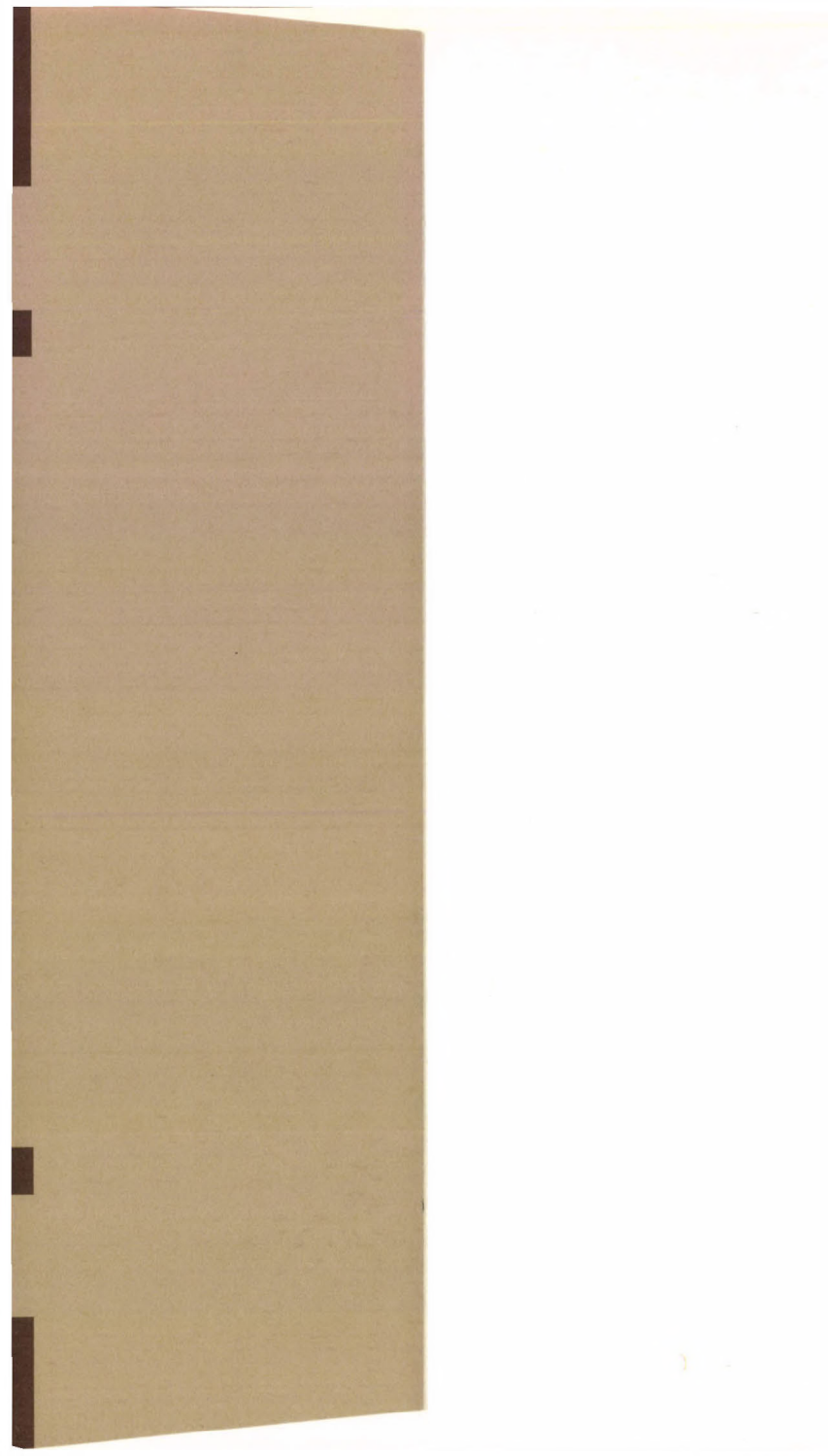
JOBST KÁZMÉR

AZ ANORGANIKUS
IONOK ÉS BIOLÓGIA
RENDSZERÜNK



36

AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST



**ÉRTEKEZÉSEK
EMLÉKEZÉSEK**

ÉRTEKEZÉSEK EMLÉKEZÉSEK

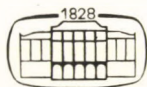
SZERKESZTI
TOLNAI MÁRTON

JOBST KÁZMÉR

AZ ANORGANIKUS
IONOK ÉS BIOLÓGIAI
RENDSZERÜNK

AKADÉMIAI SZÉKFOGLALÓ

1983. FEBRUÁR 8.



AKADÉMIAI KIADÓ, BUDAPEST

A kiadványsorozatban a Magyar Tudományos Akadémia 1982. évi CXLII. Közgyűlése időpontjától megválasztott rendes és levelező tagok székfoglalói — önálló kötetben — látnak napvilágot.

A sorozat indításáról az Akadémia főtitkárának 22/1/1982. számú állásfoglalása rendelkezett

ISBN 963 05 3969 1

© Akadémiai Kiadó, Budapest 1985, Jobst Kázmér

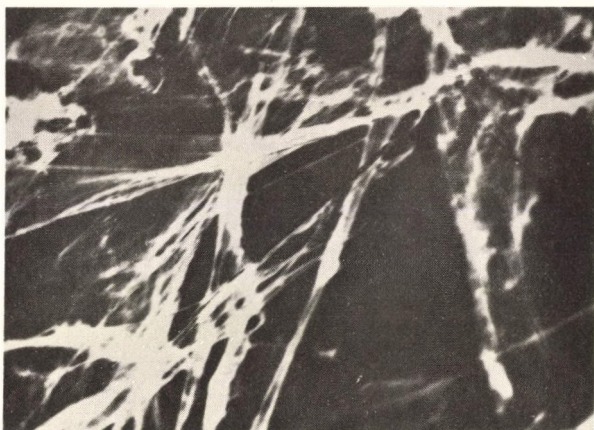
Printed in Hungary

A felnőtt ember szervezetének 68%-a víz és só. Ebből 6,1% a biológiailag jelentős, mintegy 40 anorganikus elem (21). Megoszlásuk és mennyiségük széles skálát fog át; a nyomelemek és ritka fémek ppm nagyságrendjétől a felnőtt szervezet 1200 g-os kalcium-értékéig. Részben fehérjékhez kötöttek, részben biológiailag aktív molekulákba épülnek be. Ezért ma elfogadott, hogy az életfolyamatok kemizmusai épp annyira anorganikus, mint organikus (31). Érthető tehát, hogy az anorganikus komponensek biológiai szerepének felderítésére irányuló vizsgálatok, kutatások volumene egyre nagyobb. Napjainkban azonban új megközelítésből is vizsgálják az anorganikum kemizmusát: az organikummal szerves egységben, a kettő komplexét. Ebben nem kis szerepe van a módszertani előrelépésnek. Ez nemcsak a két összetevő külön vizsgálatát tette nagy felbontású metodikákkal lehetővé, hanem a fém-fehérje komplexek, így a metalloproteidek vizsgálatát is. De az analitikai, kémiai tanulmányok mellett nem kis számú az olyan új

E tanulmány alapját képező munkákban igen jelentős része volt Dr. Kellermayer Miklósnak, valamint Dr. Ludány Andrea, Dr. Kádas István és Dr. Kosztolányi György kandidátusoknak. Kitűnő munkatárs volt Lázár Györgyné asszisztens.

megfigyelés, mely a fémek hatását követi a funkcióra, struktúrára, azok modifikálására. Az anorganikum és organikum együttes vizsgálata annál is érdekesebb, mert az élő sejtben sem szeparáltan, hanem egymással kölcsönhatásban léteznek. Amit ma ilyen élesen fogalmazunk, az 30 évvel ezelőtt mint kutatási irány, egyáltalán nem létezett. Az anorganikum dominált; mi mégis a kettő, a fehérje—fém kapcsolatának, kölcsönhatásuknak a tanulmányozásával kezdtük el Romhányi professzorral szubmikroszkópos morfológiai vizsgálatainkat, és bár módszertani oldalról más megközelítéssel, folytatjuk ma is. A következőkben két vizsgálatsorozatunk alapján mutatnám be a fém—fehérje kapcsolatát: *in vitro* a DNP és az egyértékű fémek, *in vivo* a cytoplasmáris Zn-metalloproteidek kapcsán.

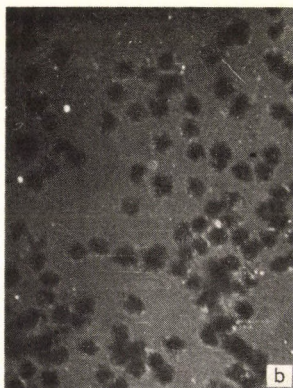
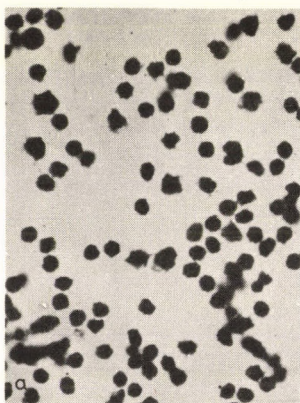
Az anorganikus sók hatását a mag DNP struktúrájára, szerkezetváltozására polarizációs mikroszkópos módszerrel vizsgáltuk. Magas, 75–80%-os víztartalom, 164 mmól K és 48 mmól Na mellett a somatikus sejtmagok optikailag izotrópok (11, 20). Ez a lelet azért is meglepő, mert W. J. Schmidt (29) már 1930-ban leírta az izolált DNS nátrium sójának negatív kettőstörését (1.kép). Ezt az optikai effektust később különböző állatok haploid spermiumában is kimutatta. E két, részben ellentmondó adatából kiindulva vizsgáltuk az egy- és



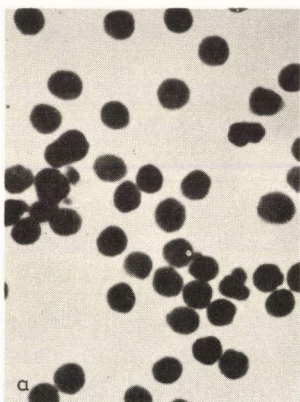
1. kép. Alkoholban kicsapott, rivanollal festett thymus nukleinsav preparátum polarizációs mikroszkópos felvétele

kétértékű ionok hatását, első helyen a nátriumét a magszerkezetre. A kérdést úgy is fogalmazhatjuk, mi az oka annak, hogy a somatikus sejtekben a chromatin DNP izotróp? Szerepe van-e az anizotrópia kialakításában az anorganikus sóknak?

Izotóniás sucrosében izolált thymus magokkal dolgoztunk (3). A sucrosében preparált magok valóban nem kettőstörők, izotrópok (2. kép). Ha azonban a sucrose oldat 0,1 mól NaCl-ot tartalmazott, diszkrét maganizotrópia alakult ki. Ez az enyhe kettőstörés az akridin festékek csoportjába tartozó rivanollal (2), valamint a Romhányi által (28) kidolgozott PTK-reakcióval többszörösére erősíthető fel (3.



2. kép. Izotóniás sucrosében izolált PTK-el festett thymus-magok a) fénymikroszkópos, b) polarizációs mikroszkópos képe. Utóbbin a magok izotrópok. ($\times 200$)



3. kép. Izotóniás sucrose-NaCl-ban izolált, PTK-el festett thymus-magok a) fénymikroszkópos, b) polarizációs mikroszkópos felvétele. A b) képen a thymus-magok intenzív kettőtörése látható. ($\times 400$)

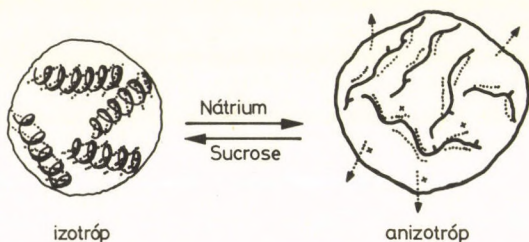
1. táblázat

IZOTÓNIÁS SUCROSÉBAN IZOLÁLT ÉS KÜLÖNBÖZŐ NaCl-TARTALMÚ KÖZEGBEN INKUBÁLT THYMUS-MAGOK KETTŐSTÖRÉSE (ÚTKÜLÖNBSÉG ÉRTÉKE)

	mmól/l Na	Útkülön- ség mμ
Sucrose	—	×
8/2 izotóniás sucrose NaCl	29	×
6/4, 4/6 izotóniás sucrose NaCl	58–87	5–7?
2/8 izotóniás sucrose NaCl	116	20,5
Izotóniás NaCl	145	23,0
Tyrode oldat	—	21,5
Hanks-oldat	—	20,5

kép). Ez a megfigyelés nagyban elősegítette a további szerkezetanalitikai vizsgálatainkat: ugyanis mindkét festék orientáltan asszociál, rendeződik a DNS-hez. Ezután megnéztük van-e összefüggés a chromatin DNS kettőtörésének kialakulása és a NaCl-koncentráció közt. Változtatva a sucrose—izotóniás NaCl arányt (3), a kettőtörés fokozatosan erősödött, értéke a NaCl-tartalmú Hanks- és Tyrode-oldatban is megegyezett a fiziológiás, 145 mmól-os NaCl-éval (1. táblázat).

Az optikai jelenség reverzibilis: az elektrolitban szuszpendált magok sucrosében ismét izotrópok. Következő lépésben megvizsgáltuk, hogy a kettőtörés kialakulását nem kíséri-e anyagvesztés. Az elképzelésünk akkor az volt,



1. ábra. NaCl feltételezett hatása a sejtmag DNP-re. A bal oldali rajz a nyugalmi magot mutatja, melyben a DNS és a hisztonfehérje szoros asszociációja miatt a DNS negatív kettőstörése nem jut érvényre; a magok ezért izotrópok (DNS kihúzott, hiszton pontozott vonal). NaCl-ra (jobb oldalt) a DNP-ről a hisztonfehérje ledisszociál, részben kioldódik. Ez lehetővé teszi a DNS elongációját, a kettőstörés kialakulását. A jelenség sucroséra reverzibilis.

hogy a fehérjék, első helyen a hisztonok, disszociációja mellett azok kioldódásával is számolhatunk (1. ábra). Talán épp ez a fehérje-veszteség teszi lehetővé a fehérje—DNS-kapcsolat lazulását követően a chromatin DNS elongációját, rendeződését, így a kettőstörés kialakulását.

A feltételezett anyagveszteség igazolására a különböző médiumokkal, sóoldatokkal előkezelt magokban interferenciamikroszkópos módszerrel határoztuk meg az össz-szárazanyag-tartalmat (3). 116 mmól NaCl-nál már enyhe, 145 mmól-os oldatban szignifikáns szárazanyag-csökkenést találtunk, ami erősíteni látszott az anizotrópia kialakulására vonatkozó feltételezésünket (2. táblázat).

2. táblázat

IZOTÓNIÁS SUCROSEBAN IZOLÁLT FIXÁLATLAN THYMUS MAGOK
SZÁRAZANYAG-TARTALMÁNAK VÁLTOZÁSA
KÜLÖNBÖZŐ NaCl-TARTALMÚ KÖZEGBEN INKUBÁLVA
INTERFERENCIAMIKROSZKÓPOS MÉRÉS.

mmól Na	Sucrose —	8/2 29	6/4 58	4/6 87	2/8 116	NaCl 145
Magok száma	30	30	30	30	30	30
Relatív szá. tartalom (10^{-12} g)	23,2 ± 1,6	23,0 ± 2,3	23,2 ± 2,8	23,0 ± 2,6	22,6 ± 3,2	18,9 ± 2,3
Felület (μ^2)	24,9 ± 2,5	25,2 ± 3,0	26,3 ± 3,9	27,5 ± 3,6	29,1 ± 4,8	36,4 ± 6,3
Sza. tartalom (10^{-12} g)	26,5	26,0	25,2	24,7	23,6	19,2
Felületegységre számított sza. tartalom (10^{-8} g/ μ^2)	10 750	10 310	9550	9020	8150	5420

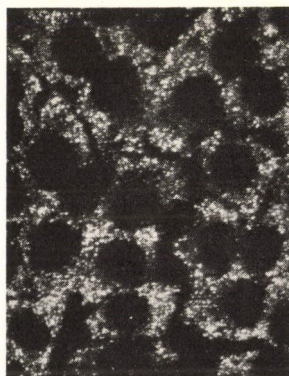
Meghatároztuk a készítmények Na- és K-megoszlását: a thymus szövetben és a sucroséban izolált magokban a káliumkoncentráció magasabb (3. táblázat). Ha a sucroséban izolált magokat nátriumionot tartalmazó médiumban (Hanks-oldat) inkubáltuk, megemelkedett a mag nátriumkoncentrációja és kialakult a kettőstörés. Az egyértékű nátriumion szerepét a kettőstörés kialakulásában ez a megfigyelés is alátámasztotta.

A sucrose oldatban izolált magok tárgylemez-készítményeinek kezelése azonban meglehetősen körülményes. A preparálás eredményeként artefaktumként nem kis számban láttunk kettőstörő magokat. Ezért a szövettenyészetek lemezkészítményeire tértünk át, ahol fedőlemezen tenyésztett sejteket analizáltunk (10, 11). A szövettenyészeti HeLa készítményeknél két új észleletet tettünk. Az előbbieken már hangsúlyoztuk, hogy a nyugalmi magok sucroséban izotrópok, és csak nátrium- vagy káliumsók hatására kettőstörők. Ez érvényes a HeLa sejtek interfázis magjaira is (4. kép). Azonban első alkalommal tudtuk polarizációs optikai módszerrel igazolni, hogy az izotróp nyugalmi magok mellett a különböző mitotikus formák kettőstörők (5. és 6. kép), és hipotóniás shock után a chromosomagarnitúra is anizotróp (15) (7. kép). Az oszló sejt chromatinja tehát minden előkezelés

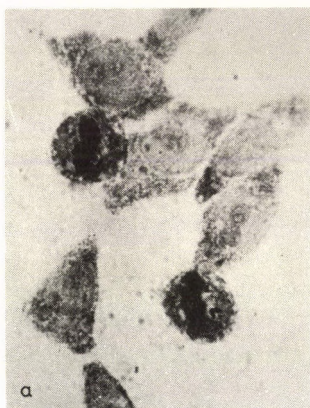
3. táblázat

THYMUS SZÖVET, IZOTÓNIÁS SUCROSÉBAN IZOLÁLT ÉS HANKS-OLDATBAN INKUBÁLT THYMUS MAGOK NÁTRIUM- ÉS KÁLIUMKONCENTRÁCIÓJA.

	Vizsg. szám	μmól/száraz g		μmól/nedves g		μmól/H ₂ O ml		H ₂ O-tart. %
		K	Na	K	Na	K	Na	
Cukoroldatban inkubált magok	26	186,3 ± 50,4	16,3 ± 5,5	42,6 ± 3,9	4,14 ± 1,3	56,7 ± 12,4	5,1 ± 1,4	24,2 ± 2,5
Hanks-oldatban inkubált magok	31	318,1 ± 57,0	463,6 ± 154,1	62,9 ± 16,3	85,9 ± 29,7	77,5 ± 18,6	109,2 ± 33,5	19,2 ± 2,1
		p < 0,001	p < 0,001			p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001
Thymus szövet	31	514,4 ± 120,7	141,7 ± 37,5	124,0 ± 15,3	35,0 ± 8,3	164,3 ± 19,6	48,0 ± 15,5	24,8 ± 4,5



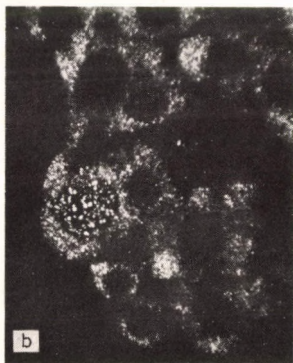
4. kép. Fedőlemezen tenyésztett PTK-el festett HeLa sejtek polarizációs optikai felvétele: a nyugalmi sejtmagok izotrópok, csak az ergastoplasma (RNP) kettőtörő. ($\times 600$)



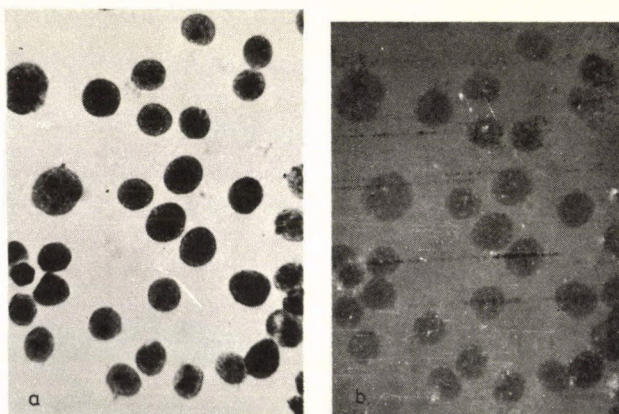
5. kép. HeLa lemezkészítmény a) fénymikroszkópos, b) polarizációs mikroszkópos felvétele. A nyugalmi magok izotrópok, de az oszló (metafázis) sejtmag kettőtörő. PTK-festés ($\times 800$)



6. kép. PTK-el festett HeLa lemezkészítmény polarizációs mikroszkópos felvétele: csak a tripolárisan osztódó és anafázis mag chromatinja kettőtörő, a nyugalmi magok izotrópok.
($\times 800$)



7. kép. HeLa lemezkészítmények a) fény és b) polarizációs optikai felvétele hipotóniás shock után. PTK festés. Az anafázis magban a chromosoma garnitúra intenzíven kettőtörő. ($\times 400$)



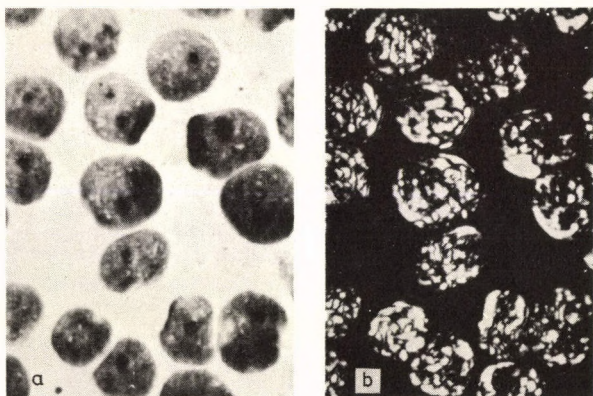
8. kép. 0,03 mól NaCl és 0,1% NP 40 tartalmú izotóniás sucroséval lemeztenyészetben izolált HeLa magok

a) fénymikroszkópos, b) polarizációs mikroszkópos képe.

A magok izotrópok. PTK festés. ($\times 400$)

nélkül, primeren a polarizációs optikai (PO) módszerrel jól demonstrálható orientált strukturális elrendezést mutat. Az eltérő felépítést a fénymikroszkópos morfológia régtől ismeri, azonban ilyen szembetűnő szerkezeti különbségekre még az EM-morfológia sem szolgáltatott meggyőzőbb adatot.

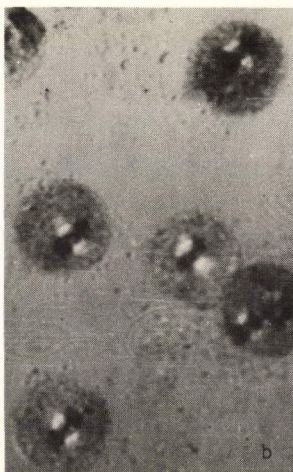
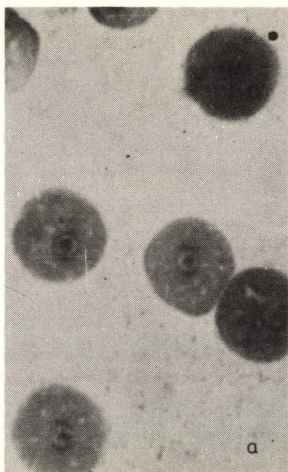
A második észlelet az *in situ* izolált szövettenyészetű magokra vonatkozik. Sucrosében oldott Nonidet P40 (NP 40) nem ionos detergenseel módszert dolgoztunk ki HeLa, majomvese szövettenyészetű magok izolálására (12). Eljárásunkkal a lemezre továbbra is jól



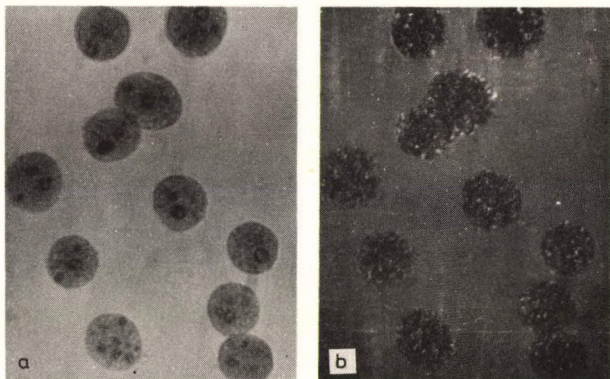
9. kép. 120 mmól NaCl és 0,1% NP 40 tartalmú izotóniás sucrosével lemeztényészetben izolált HeLa magok a) fény, b) polarizációs felvétele. PTK festés. A fénymikroszkópos képen a nucleolus kontúrja elmosódott. A b) felvételen az egész magállomány durván rögös kettőtörést mutat. ($\times 800$)

tapadó, cytoplasma- és külső maghártýamentes magokhoz jutottunk (8. kép). Az NP 40-nel izoláltuk a későbbiekben a thymus és nyirokszöveti magokat is.

A felvétel a sucrosében izolált izotróp magokat mutatja. Ha az izolálást Hanks-oldatban végeztük, az egész mag intenzíven kettőtörő (9. kép), amit a mag heterochromatin struktúrájára vezetünk vissza. Ez az intenzív optikai effektus 144-től 120 mmól/l ionkoncentráció közt változatlan volt. Ha azonban az ionkoncentrációt 90 mmól/l alá csökkentet-

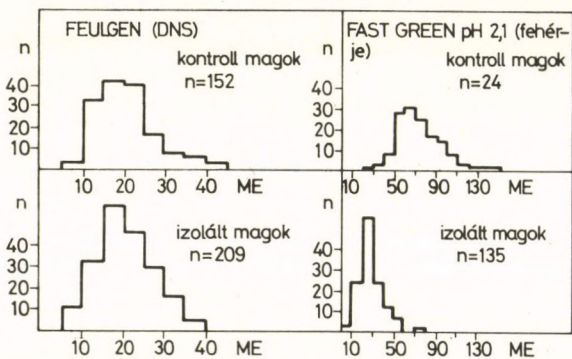


10. kép. 90 mmól NaCl és 0,1% NP 40 tartalmú izotóniás sucrosével lemeztenyészetben izolált HeLa magok a) fény, b) kompenzált, c) nem kompenzált polarizációs optikai felvétele. PTK festés. A fénymikroszkópos képen a homogen karyoplasmában jól elkülönül a nucleolus a perinucleolaris chromatin gyűrűvel. A polarizációs felvételen a nucleolushoz asszociált heterochromatin intenzív kettőstörése dominál. A karyoplasma csak diszkrétan kettőstörő (euchromatin). ($\times 800$)



11. kép. 70 mmól NaCl és 0,1% NP 40-et tartalmazó izotóniás sucroséval lemezkészítményen izolált HeLa magok. A fénymikroszkópos felvételen, a) jól kirajzolódik a nucleolus a perinucleolaris heterochromatinnal. A polarizációs képen, b) az egész mag finom szemcsés, diffúz kettőtörést mutat (euchromatin). A perinucleolaris heterochromatin izotróp.
($\times 600$)

tük, csak a perinuclearis heterochromatin kettőtörése látható (10. kép), ami DNase emésztésre megszűnt. Ez amellet szól, hogy a nucleolus körül a DNP micellák rendezetten helyezkednek el. 70 mmól kationkoncentráció alatt perinuclearis heterochromatin sem tűnhet már fel PO módszerrel és a magplazmában csak diszkrét, finom, feltehetően az euchromatintól eredő kettőtörés látható (11. kép). E vizsgálatsorozat különböző chromatin-struktúrák iondependens anizotrópiáját igazol-



2. ábra. 0,1% NP 40-et tartalmazó izotóniás sucrosében (kontroll) és Hanks-oldatban izolált HeLa magok DNS (Feulgen) és összfehérje (Fast green pH 2,1) tartalma. Cytophotometriás mérés.

ta, a különböző DNP-struktúrák disszociációjának eltérő ionérzékenységet (9, 13, 14). Megemlíteném, hogy a monovalens nátrium, de káliumionokra kialakuló differenciált kettőstörés, ami a kétértékű kalcium esetében csak tízszer nagyobb ionkoncentrációnál alakul ki, reverzibilis, annak ellenére, hogy a kvantitatív cytophotometriás mérések szerint változatlan DNS mellett jelentős szárazanyag (18) (4. táblázat), mintegy 60% fehérjevesztéséget mértünk (16) (2. ábra). Ez a megfigyelés is alátámasztani látszott a már említett leletet és feltételezést, hogy a magchromatin kettőstörés kialakulásának magfehérje-vesztés az előfeltétele. A fehérjevesztés milyenségét morfológiai

4. táblázat

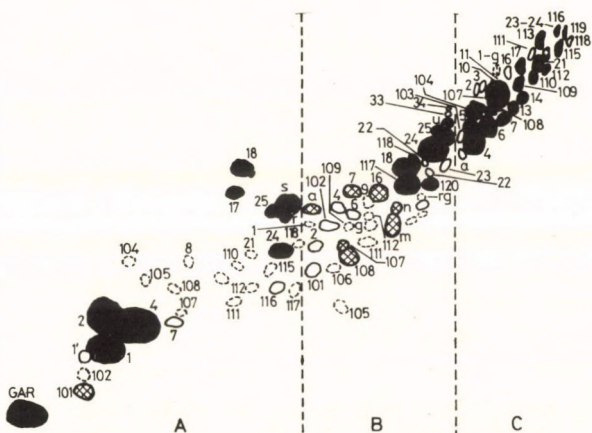
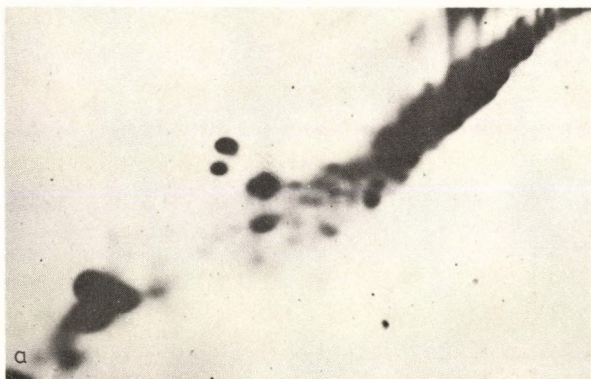
IZOTÓNIÁS SUCROSÉBAN ÉS HANKS-OLDATBAN IZOLÁLT HeLa MAGOK SZÁRAZANYAG-TARTALMA. INTERFERENCIAMIKROSZKÓPOS MÉRÉS.

	Kontroll intact mag		Izolált mag 0,25 mól sucrosében	Izolált mag Hanks-oldatban	
	nucleus	nucleolus		nucleus	nucleolus
Mért magok száma	172	—	111	164	—
Felület μ^2	159,4 \pm 43,7	14,4	240,2 \pm 57,2 p < 0,001	153,1 \pm 38,7 p > 0,3	10,4
Szárazanyag $\times 10^{-12}$ g	152,4 \pm 49,8	24,0 \pm 15,1	—	57,0 \pm 14,2	8,8 \pm 4,6
Össz:	176,5 \pm 50,2		118,7 \pm 22,8 p < 0,001	65,8 \pm 15,8 p < 0,005 < 0,001 < p < 0,01	
Koncentráció $\times 10^{-12}$ g/ μ^2	0,97	1,55	0,36	0,36	0,84

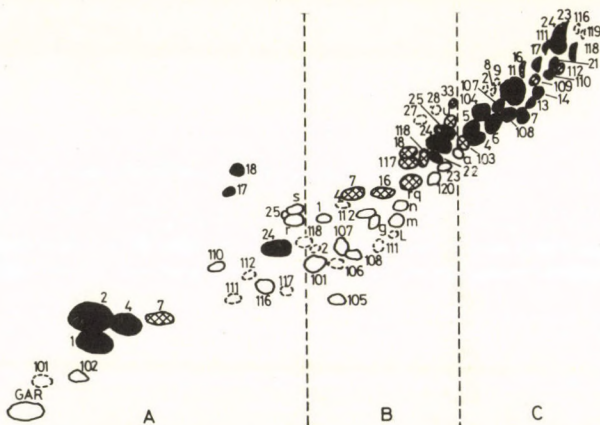
módszerekkel azonban nem tudtuk igazolni. Ezért vizsgálatainkat analitikai biokémiaiakkal szélesítettük, közelebbről, kétdimenziós poliakrilamid gél (PAG) elektroforézissel. E kísérletektől választ vártunk arra, izolált magokból elektrolitoldat hatására milyen típusú fehérjék oldódnak ki, magarázható-e extrahált fehérje képpel a leírt PO-változás.

Májsejtmagokat $+4^{\circ}\text{C}$ -on 2,2 mól sucrose—3,3 mmól kalciumacetát oldatban izoláltunk, majd 20 percig ún. TN (0,15 mól NaCl, 0,01 mól Tris), TS (0,25 mól sucrose, 0,01 mól Tris) és TSCM (0,25 mól sucrose, 0,01 mól Tris, 3,8 mmól CaCl_2 és 12 mmól MgCl_2) oldatban inkubáltuk (17, 19). A magok szupernatánsát itt nem részletezett több lépcsős kezelés, koncentráls és adaptálás után a második dimenzióban SDS-urea közegben pH 7,1-es foszfát-pufferben választottuk szét. A fehérjefoltokat Coomassie-kékkel tüntettük fel.

A TN-Tris extraktumban lemezzgelen 95 folt különíthető el (3a, 3b ábra). Dominálóan csak az A régióban találtunk 10–25 000 mólsúlyú chromosomális hiszton-fehérjét (ami összhangban van a mintegy 2,5% DNS veszteséggel). Azonban a magasabb mólsúlyú B és C régióban (60 és 180 000 dalton) nem kötött, lazán kötött nem hiszontípusú fehérjék is kimutathatók, extrahálódtak.

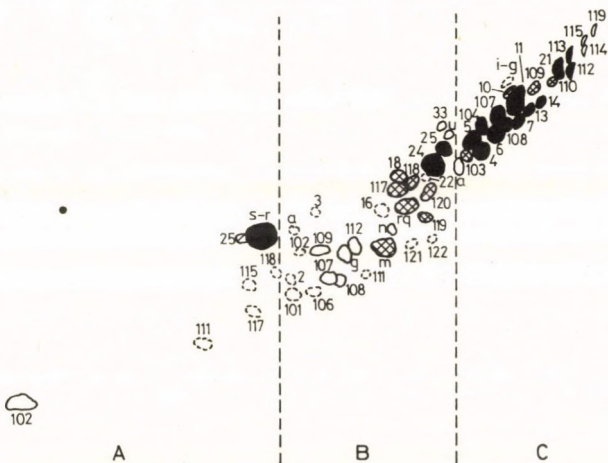


3. ábra. a) TN oldattal extrahált izolált májsejtmagok fehérjeképe kétdimenziós poliakrilamid-gél elektroforetikus elválasztás után. Az ábra a második dimenziót mutatja. b) A Coomassie kékel festett lemezgél kirajzolt fehérje foltjai. A, B, C-vel a kis-, közép- és nagy mólsúlyú régiókat jeleztük.



4. ábra. TS oldattal extrahált izolált májsejtmagok fehérjeképének elektroferogramja kétdimenziós poliakrilamid-gél elválasztás után. (Az ábrán a második dimenzió látható.)

Nem kis meglepetésre a nem ionos TS oldatban a TN oldathoz sokban hasonló volt a fehérjekép (4. ábra): itt is extrahálódtak, bár kisebb számban és mennyiségben, hisztontípusú fehérjék (A régió). Neutrális pH-n nehezen magyarázható, miért szabadul fel a negatív DNS és pozitív hisztion közti elektrosztatikus kötés, hisz extrakciójához a savas közeg vagy 0,6-nál magasabb ionerősség az optimális. Csak a pH (7,1) hatással magyarázhatjuk, ami egész lazán kötött hisztionfehérjék kioldódását veti fel. Ellentétben a két előbbi képpel, TSCM-oldatban, tehát divalens kalcium- és magnéziumtartalmú közegben, hisztionfehérjék alig extrahálódtak (5a, 5b ábra). A B és C régióban



5. ábra. a) TSCM oldattal extrahált májsejtmagok fehérjeképe kétdimenziós poliakrilamid elektroforetikus elválasztás után.
b) Coomassie kékkel festett gél fehérje foltjainak rajzos ábrázolása.

azonban több fehérje extrahálódott, melyek a korábban szolubilisnek nevezett fehérjékhez tartoznak és a mag-sap (víz) integráns részét képezik (8). Itt említeném meg, hogy a TSCM kezelt magok EM képe, előbbiekkal szemben, kondenzált magszerkezetet mutat.

A fehérjeanalitikai vizsgálatokat egybevetve szubmikroszkópos morfológiai leleteinkkel, megállapíthatjuk, hogy mind a kettőstörő NaCl-os (TN), mind az izotróp ionmentes sucrosés (TS) magokból eltérő mennyiségben chromosomális hisztontípusú fehérjék oldódtak ki. A két extraháló oldat közt tehát csak az anorganikus sóban, NaCl-ban volt különbség. Ugyankor a TSCM oldatban sem hisztionvesztéset, sem anizotrópiát nem észleltünk. Leleteink korábbi feltételezésünket — a chromosomális hisztionfehérjék disszociációja, kioldódása indukálja a nukleinsav elongációját, teszi így az orientált festékkötést, a kettőstörés kialakulását lehetővé — nem támasztják alá (vö. 1. ábra). A magszerkezetváltozást tehát a chromosomális hisztionfehérjék zöme elsődlegesen nem determinálja. Ezt támogatja a már említett régebbi megfigyelésünk, a sókezeléssel kiváltott maganizotrópia a nem ionos sucroséban reverzibilis: a magok sucrose kezelésre izotrópok.

A PAG képben bemutatott extrahálódott fehérjék tehát nem fejtenek ki protektív hatást a

DNS szerkezetváltozására. Így a szerkezetváltozást a magban visszamaradó nem extrahálódott fehérjékkel kell kapcsolatba hozni, értelmezni és nem a kioldódott fehérjéknek, mint azt korábban feltételeztük, van ebben szerepe.

Olins és Olins (25), Nicolini és Baserga (23), Richards és munkatársai (27) vizsgálatai mind a nyugalmi, mind a mitosisos magok chromatinjában egy subunit, nü body, más névvel nucleosoma szerkezetet vesznek fel, amit a spiralizált vagy a nyújtott DNS kapcsol össze. A nucleosomákban van a hisztonfehérjék zöme, a DNS-lánc ezeket mintegy bezárja. Kivétel Bradbury és munkatársai szerint (1) a H_1 hiszton, mely hidat képez a spiralizált DNS két szakasza közt. A H_1 molekula egyik vége kovalens kötésben van a DNS foszfátcsoportjaival, a másik lazán kötött a DNS-hez, és arról már alacsony (0,1) ionerősségnél ledisszociál, ha tehát a szabad ionkoncentráció egy kritikus értéket ér el. Az élő nyugalmi sejtben a H_1 hiszton biztosítja a DNS spiralizált szerkezetét. Önmagában a H_1 hiszton azonban nem védheti ki a szabad ionhatást, amit az is igazol, hogy az élő sejtben a kálium- és nátrium-ionkoncentráció 0,12 mól-nál magasabb, mégsem kettőtörők a magok. Ma úgy látjuk (20), hogy elsőként az ún. szolubilis nem chromosomális magfehérjék kötik meg az élő nyugalmi sejtben a szabad ionokat és védik így a DNS-t a

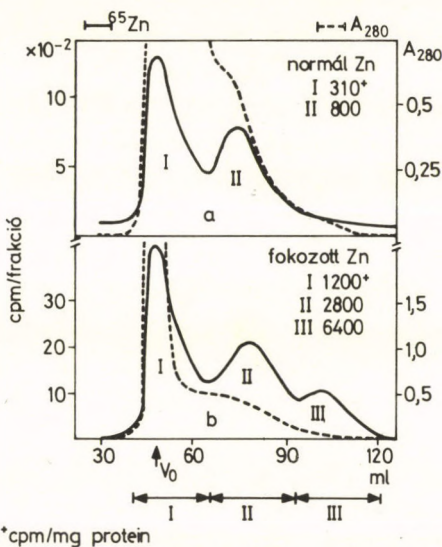
(szabad) ionhatástól, regulálják a DNS-hiszton körül a szabad ionkoncentrációt. E szolubilis magfehérjék lazán kötöttek (8), dinamikus asszociáltak a chromosomális fehérjékhez, azokból alacsony ionitású elektrolittal könnyen kioldhatók. A sejtciklus különböző fázisaiban a fehérje mellett a mag/cytoplasma iongrádiense is változik, a mag ionkoncentrációja emelkedik. Ha a védő fehérjerendszer ezt az emelkedett ionitást nem tudja kivédeni, ha mennyisége lecsökken, esetünkben kioldódik, akkor a DNS spirális szerkezetét stabilizáló H_1 hisztonra már közvetlenül hatnak a szabad ionok, annak laza kötését hasítják, ami a DNS despiralizációjához, elongációjához vezet. Az így despiralizált, elongált DNS-szegmentek a festékmolekulákat már orientáltan köthetik, így felerősödik a magchromatin saját kettőstörése. Mitosisos chromosomákban a nucleosoma kondenzációja mellett valamennyi DNS despiralizálódik, ami magyarázza a magok igen erős kettőstörését. A fehérjeanalitikai vizsgálatok a fentieket alátámasztják. A sejtmagok mind hiszton jelenlétében (TSCM), mind hisztonvesztés (TS) esetében is izotrópok. Csak egyértékű szabad ionos közegben alakul ki az előbbtől nem lényegesen eltérő fehérjevesztés mellett olyan szerkezetváltozás, ami a DNS despiralizálódását, kettőstörés kialakulását eredményezi. Az ani-

zotrópia közvetlen kiváltója tehát az emelkedett szabad ionkoncentráció, melynek hatását speciális fehérjék szabályozzák.

A kétértékű kalcium után, ami az egyértékű NaCl-tól eltérő fehérjespektrumot és morfológiai képet mutatott, kísérletet tettünk a háromértékű fémionok ilyen vizsgálatára. A ritka földfémek csoportjába tartozó könnyű lantanidák biológiai hatását komplex módszertannal tanulmányoztuk (4, 6). Választásunk azért esett a háromértékű lantánsókra, melyeket újabban „szuperkalciumnak” is neveznek, mivel a membránhoz kötött kalciumot lecserélve azokhoz igen erősen kötődnek. Az itt nem részletezett eredményeink közül csak az EM adatokra utalok, melyek arra mutatnak, az erős membránkötődés miatt a lantánsók aligha jutnak be a sejtbe, csak az extracellularis térben mutathatók ki (5). Sejten belüli megoszlásuk, in vivo kapcsolatuk a subcellularis komponensekkel így nem vizsgálható. Pedig csak az ilyen intracellularis vizsgálatok kapcsán ismerhetjük meg, a fém szabad vagy kötött formában van-e a sejtben, a metalloproteidek típusait, sajátosságait. E vizsgálatokat ezért Zn-kel végeztük, melyről ismert, a májsejt cytoplasmában igen magas koncentrációban van és melynek szerepét—hiányát az elmúlt évek során mind több betegségnél igazolták a klinikai kép, tünetek kialakulásában (26). Célkitűzésünk a Zn intra-

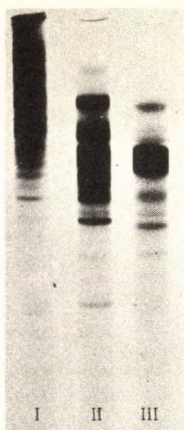
cellularis megoszlásának, a cink-fehérje komplexnek a vizsgálata volt. A kísérletekhez ^{65}Zn izotóppal jelölt és Zn-terhelt állatok májából a 100 000 g-os szupernatánst, a cytosolt dolgoztuk fel (22). Fiziológias körülmények közt a cytosol igen gazdag cinkben, nem ultrafiltrálható, ami erős Zn-fehérje kötésre utal. E cytosol fehérjék analízisét végeztük el a Zn-fehérje kötést nem denaturáló módszerekkel: Sephadex G75 oszlop-kromatográfiát követő 5–20%-os exponenciális gradiens gélelektroforézissel. Az izotópos detektálás nagyban könnyítette a Zn-fehérje frakciók lokalizálását. A 6. ábra felső részén a normális, per os bevitel után készült kromatogramon két Zn-kötő fehérjecsúc, frakció különíthető el. Az I. jelzésű mólsúlya 70 000, a II. jelzésű 30–40 000 közt van. A II. csúc a Zn 45%-át tartalmazta, és specifikus aktivitása közel kétszer nagyobb volt a nagy molekulású I. csúcsnál. Az így izolált Zn-metalloprotein igen stabil komplex, nem denaturáló körülmények közt, pl. dialízisre, a Zn-fehérje kötések csak kismértékben szakadnak fel, elektromos térben a cink 80%-a a fehérjekötésben marad. A kromatogram tehát a cytosolra jellegzetes Zn-protein képet mutatott.

Az alsó képen az i. p. cink terhelésre egy harmadik magas specifikus aktivitású (III) csúc is megjelent. Ez a frakció ultraibolya



6. ábra. a) ^{65}Zn -kel per os, b) ^{65}Zn -kel intraperitoneálisan előkezelt patkány májsejt cytosolnak Sephadex G75 kromatogramja. Kihúzott vonal ^{65}Zn radioaktivitás, szaggatott vonal 280 nm-es UV abszorpció.

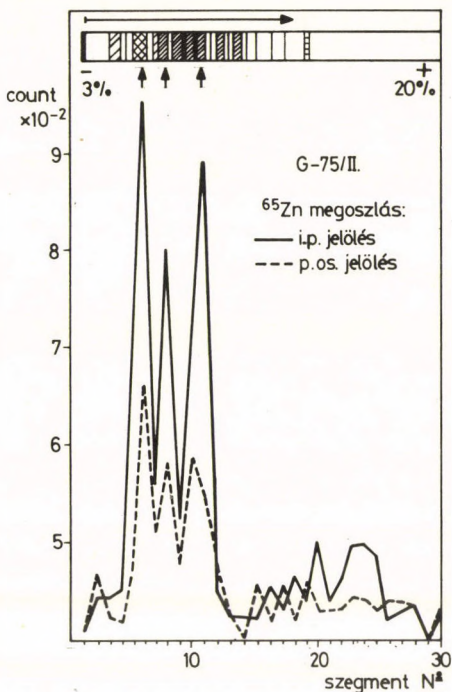
fényben 280 nm-nél nem mutat elnyelést, vagyis aromás aminosavak nem jellemzők e fehérjére. Az irodalmi adatok alapján (7, 30) ezt a csúcsot a fehérjék speciális csoportjába tartozó metallothioneinnek tartjuk, melyet kadmium, higany terhelés kapcsán írtak le, és speciális védő, fémsequestráló funkcióval hozzák megjelenésüket kapcsolatba. Az izolált Zn-metalloproteinek stabilitása elektromos térben tette lehetővé további elválasztását PAG elektroforézissel, gradiens gélben.



7. ábra. A ^{65}Zn -kel intraperitoneálisan előkezelt patkány májsejt cytosol Sephadex G75 elválasztása során kapott I., II., III. frakciójának (6. ábra) további frakcionálása exponenciális poliakrilamid-gélen. Amidofekete festés.

A két kísérletben a kromatográfiás I. és II. Zn-metalloprotein csúcs azonos volt, ezért csak az i. p. Zn terhelés során kapott I–III. frakció további PAG analízisét mutatjuk be (7. ábra). Az elválasztás során számos éles fehérjecsíkot is kaptunk. A fehérjeszegmentek izotóp aktivitása egyben jellemezte a fehérjék Zn-kötését.

Az I. frakcióból készített PAG gél fehérje képe heterogén, így nehezen értékelhető. A Zn vonatkozásában specifikus aktivitása amúgy is igen alacsony. Így jelentős metalloproteid itt nem feltételezhető. Ezért nem is vizsgáltuk tovább. A II. közepes mólsúlyú frakcióból elsőként írtuk le a három eltérő mobilitású,



8. ábra. A ^{65}Zn radioaktivitás megoszlása a 7. ábra II. frakciójának (intraperitoneális kezelés) poliakrilamid-gélen (fent a kivágott gélfrakció rajza) történt elválasztása után (kihúzott vonal). A szaggatott vonal a per os kezelt állatok azonos frakciójának aktivitását mutatja.

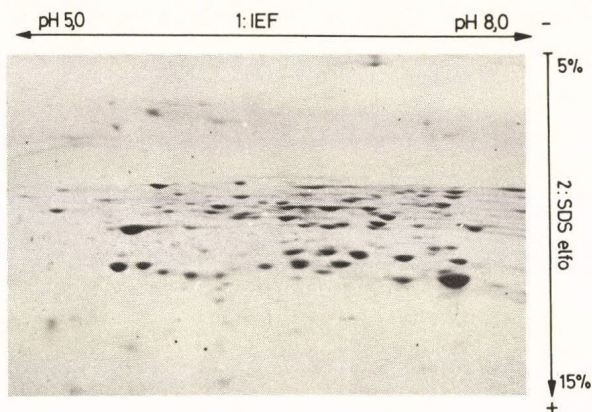
magas ^{65}Zn aktivitású fehérjecsíkot (8. ábra). Azonosításuk további vizsgálatokat igényel még.

Végül III. kromatográfiás Zn-thionein frakcióban a Zn a II. frakciónál sokkal lazábban kötött a fehérjéhez, az elektroforézis során

elveszti aktivitásának 65–70%-át. Bár fehérjefestéssel több éles és erős fehérjecsík különíthető el, azokban Zn-izotóp már nem detektálható. Ma még nem tudjuk pontosan megmondani, melyik (esetleg már polimerizált) csík felelhet még a Zn-kötő metallothioneinnek.

Összegezve megfigyeléseinket: fehérjeanalitikai módszerekkel a normál állat-májsejt cytosol sajátos Zn-fehérje képet mutat. Zn-terhelésre fokozott cytosol Zn-érték mellett a cytosol Zn-fehérje megoszlása a normáltól eltér, azt a Zn-thionein frakció jellemzi. A közép mólsúlyú frakcióban három magas ^{65}Zn aktivitású csíkot figyeltünk meg, melyben a fém a fehérjével stabilis komplexet képez, ez azonban nem zárja ki a további ilyen Zn-komplex jelenlétét.

A bemutatott Zn-metalloproteid kép és megoszlás a cellularis viszonyok összetettségére utal. Az intracellularis fehérjekép azonban korántsem ilyen egyszerű, amiről a cytosol teljes fehérjespektruma alapján győződhetünk meg, melynek csak egy töredékét képezik az előbb ismertetett Zn-metalloproteid csíkok. IEF-os és SDS gradiens gélben O'Farrel szerint (24) elválasztott cytosolból mintegy 150 fehérjefolt tüntethető fel (9. ábra). Ez nem meglepő, hisz többek szerint a magasabb szervezetek sejtjeiben 20–30 000 különböző fehérje van. A heterogenitásról, a foltok zöméről ma még nem



9. ábra. Normál májsejt cytosol fehérjefrakciói O'Farrel szerint szétválasztva. Első dimenzió: izoelektromos fókuszálás (IEF), második dimenzió SDS gradiens gél elektroforézis.

Detektálás: Coomassie kék festés.

tudjuk, milyen fehérjének felelnek meg, mi azok szerepe. Mindenesetre e kép kijelöli a további ilyen kutatások egyik lehetséges útját.

A bevezetőben említettem, hogy az élő szervezet legalább annyira anorganikus, mint organikus. Az anorganikus Na, Ca, Zn-re vonatkozó megfigyeléseink újabb adatokkal támasztották alá az anorganikus és organikus rendszer szoros kapcsolatát. Rámutattak egyrészt, hogy alapkutatási szinten a fémeket ma már speciális, kis molekulásúlyú fehérjéikkel — hiszton, fém-apoproteinnel — együtt, komplexitásukban kell vizsgálni, ami a subcellularis szintű vizsgálatokkal valósítható meg. Másrészt gya-

korlati, diagnosztikus tevékenységükben a jövőben előrelépést talán nem annyira a szérumszövetnedvek nem kötött, szabad fémtartalmának, mint a fém—fehérje komplexek szérumban végzett kimutatásától, meghatározásától és a szöveti—biopsiás minták fém—fehérje komplexeinek analizisétől várhatunk. A metalloproteidek cellularis szintű alapkutatási eredményeire támaszkodva így fejlesztjük talán magasabb színvonalra a klinikai kémiai diagnosztikát.

IRODALOM

1. BRADBURY, E. M.-CHAPMAN, G. E.-DANBY, S. E.-HARTMAN, P. G.-RICHES, P. L. (1975): Studies on the Role and Mode of Operation of the Very-Lysin-Rich Histone $H_1(F_1)$ in Eukaryote Chromatin. *Eur. J. Biochem.* 57, 521.
2. JOBST, K. (1962): A magnukleinsavak szubmikroszkópos szerkezetére és histochemiájára vonatkozó vizsgálatok. Thesis, Pécs
3. JOBST, K.-KELLERMAYER, M. (1967): Submicroscopic Structure and Dry Weight of Isolated Thymus Nuclei Following Trypsin and Salt Treatment. Polarization Optical, Interference Microscopic and Cytophotometric Studies. *Acta Morph. Acad. Sci. Hung.* 15, 221.
4. KÁDAS, I. -JOBST, K. (1973): Liver Damage Induced by Lanthanum Trichloride. *Acta Morph. Acad. Sci. Hung.* 21, 27.
5. KÁDAS, I.-LAPIS, K.-JOBST, K. (1974): Electron Microscopic Studies of Liver Changes Induced by Lanthanum Trichloride. *Acta Morph. Acad. Sci. Hung.* 22, 343.
6. KÁDAS, I.-TANKA, D.-KELLER, M.-JOBST, K. (1974): Enzyme-Histochemical and Biochemical Study of Liver Injury Induced by Lanthanum Trichloride. *Acta Morph. Acad. Sci., Hung.* 22, 35.
7. KÄGI, J. H. R.-NORDBERG, M. (eds) (1979): *Metallothionein*. Birkhäuser Verlag, Basel
8. KELLERMAYER, M. (1980): Soluble and „Loosely Bound” Nuclear Proteins in Regulation of the Ionic Environment in Living Cell Nuclei. *Intern. Cell Biol.* Ed: SCHWEIGER, H. G., Springer Verlag, 1981.

9. KELLERMAYER, N.-JOBST, K. (1970): Ion-Dependent Anisotropy of Deoxyribonucleoprotein Structures in Tissue Cultures. *Exp. Cell Res.* 63, 204.
10. KELLERMAYER, M.-JOBST, K. (1970): Ultrastructural Changes in the Nucleoproteids of Tissue Cultures. *Acta Morph. Acad. Sci. Hung.* 18, 335.
11. KELLERMAYER, M.-JOBST, K.-ANGYAL, T. (1970): Polarization-Optical Study of the Ultrastructure of Cell Nuclei in Tissue Cultures. *Acta Morph. Acad. Sci. Hung.* 18, 131.
12. KELLERMAYER, N.-JOBST, K. (1971): Isolation of Cell Nuclei in Coverslip Cultures. *Beitr. Path.* 142, 321.
13. KELLERMAYER, N.-JOBST, K. (1971): Perinuclear Chromatin-like Bodies in Small Lymphocytes. *Folia Biol.* 17, 59.
14. KELLERMAYER, M.-JOBST, K. (1971): Characterization and Differentiation of Nuclear Chromatin Structures by Ion Sensitivity. *Acta. Biol. Acad. Sci. Hung.* 22, 321.
15. KELLERMAYER, M.-JOBST, K. (1971): On the Submicroscopic Structure of Chromosomes. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 22, 25.
16. KELLERMAYER, M.-JOBST, K. (1972): The Ultrastructure of DNP Systems in Tissue Cultures as Revealed by the Polarization Microscope. *Symp. Biol. Hung.* 14, 137.
17. KELLERMAYER, M.-OLSON, M. O. J.-SMETANA, K.-DASKAL, I.-BUSCH, H. (1974): Effect of Various Ionic Media on Extraction of Soluble Nuclear Proteins and on Nuclear Ultrastructure. *Exp. Cell Res.* 85, 191.
18. KELLERMAYER, M.-SOMFAI, M.-JOBST, K. (1975): Determination of Saline Extractable Material of HeLa Cell Nuclei. *Cytobiologie* 11, 240.

19. KELLERMAYER, M.–LUDÁNY, A.–JOBST, K. –BUSCH, H. (1977): Effect of Divalent Cations on the Extraction of Nuclear Proteins. *Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung.* 12, 353.
20. KELLERMAYER, M. – HAZLEWOOD, C. F. (1979): Dynamic Inorganic Ion-Protein Interactions in Structural Organisation of DNA of Living Cell Nuclei. *Cancer Biochem. Biophys.* 3, 181.
21. KORTE, F. (1973): *Methodicum Chemicum*. Teil I.–II. G. Thieme Verlag, Stuttgart
22. LUDÁNY, A.–KELLERMAYER, M.–JOBST, K. (1980): Zn-Binding Protein Profile of Rat Liver Cytosol. Chromatographic and Electrophoretic Study. *Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung.* 15, 237.
23. NICOLINI, C. S. Ng.–BASERGA, R. (1975): Effect of Chromosomal Proteins Extractable with Low Concentrations of NaCl on Chromatin Structure of Resting and Proliferating Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 72, 2361.
24. O'FARREL, P. H. (1975): High Resolution Two-Dimensional Electrophoresis of Proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007.
25. OLINS, A. L.–OLINS, D. E. (1974): Spheroid Chromatin Units (nu Bodies). *Science* 183, 330.
26. PRASAD, A. S.–OBERLEAS, D. (1976): *Trace Elements in Human Health and Disease*. Vol. 1. II. Acad. Press N. Y. San Francisco/London
27. RICHARDS, B. J.–PARDON, D.–LILLEY, R. –WOOLEY, J. (1977): The Substructure of Nucleosomes. *Cell Biol. Int. Rep.* 1, 107.
28. ROMHÁNYI, G. (1963): Über diesubmikroskopische strukturelle Grundlage der metachromatischen Reaction. *Acta Histochem.* 15, 201.

29. SCHMIDT, W. J. (1937): *Polarisationsoptische Analyse des submikroskopischen Baues von Zellen und Geweben*, Abderhalden: Handbuch der biologischen. Arbeitsmethoden, Abt. V, Teil 10, Berlin
30. WEBB (ed) (1979): *The Chemistry, Biochemistry and Biology of Cadmium*. Elsevier North-Holland, New York
31. WILLIAMS, R. J. P. (1971): *Catalysis by Metalloenzymes: the Entatic State*. Inorg. Chim. Acta Revs. 5, 137.

A kiadásért felel az Akadémiai Kiadó és Nyomda igazgatója

Felelős szerkesztő: Klaniczay Júlia

A tipográfia és a kötéstervezés Lőblin Judit munkája

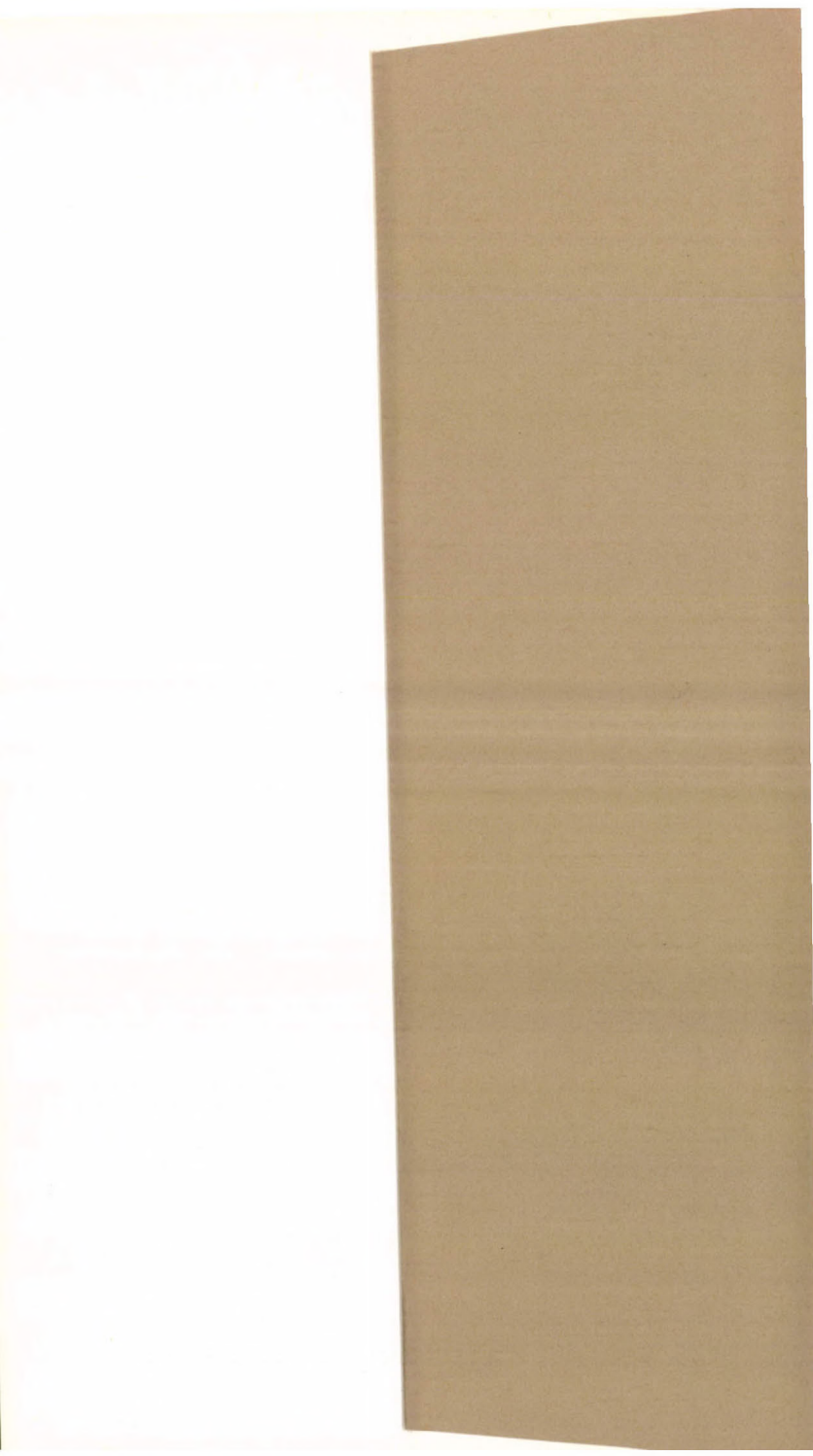
Műszaki szerkesztő: Érdi Júlia

Terjedelem: 1,98 (A/5) ív — AK 1742 k 8587

HU ISSN 0236-6258

13731 Akadémiai Kiadó és Nyomda

Felelős vezető: Hazai György



Ára: 16, - Ft